TeSeE™ SAP Combi Kit

Protocolo rápido

192 Pruebas	Ref.: 355-1186
384 Pruebas	Ref.: 355-1192
768 Pruebas	Ref.: 355-1191

KITS DE REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN *IN VITRO* DE LA PrP^{Sc}

En la unión Europea este test se ha aprobado como un test rápido para los programas de detección de la encefalopatía espongiforme y la tembladera (scrapie) en los bovinos, ovejas y cabras. Estos programas se han establecido conforme al anexo 3, capítulo A de la regulación (CE) n° 999/2001.

Manual de instrucciones

BIO-RAD

ÍNDICE

1 - INFORMACIÓNES GENERALES

2 - TeSeE™ SAP Combi Kit
- 2-1 Principio
- 2-2 Muestras
- 2-3 Composición de los TeSeE™ SAP Combi Kits
- 2-4 Preparación de los reactivos
- 2-5 Conservación, caducidad
- 2-6 Procedimiento
- 2-7 Cálculo e interpretación de los resultados
- 2-8 Límites de la prueba

3 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

4 - PRECAUCIONES

5 - NORMAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD

6 - BIBLIOGRAFÍA

1 - INFORMACIÓNES GENERALES

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son enfermedades degenerativas lentas del sistema nervioso central producidas por agentes transmisibles no convencionales (ATNC), llamados priones.

Las EET se suelen clasificar, según su causa, como iatrogénicas, familiares o esporádicas. En el siglo XVIII se describió la tembladera (scrapie) y se demostró su transmisión (incluída a cabras). Sin embargo, los mecanismos de contaminación dentro de los rebaños siguen estando poco claros. Las EETs también se describieron en el visón, en el ciervo y en el alce (enfermedad debilitante crónica, EDC) y en la vaca (encefalopatía espongiforme bovina, EEB).

Los seres humanos son también susceptibles a determinadas formas infecciosas de EETs. Hay pruebas convincentes que indican que la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) ha pasado de los bovinos al ser humano, probablemente debido al consumo de carne contaminada.

Además de esta forma variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), otras formas en los seres humanos son el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica.

Se han demostrado formas hereditarias puras (como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker [GSS]) y la ECJ esporádica en seres humanos, pero sus incidencias son muy bajas. No sabemos si existen casos esporádicos similares de EETs en animales.

Las principales características de estas enfermedades son:
- una evolución lenta y progresiva pero siempre mortal,
- ausencia de un agente infeccioso convencional,
- acumulación progresiva en el sistema nervioso central de una isoforma anormal de una proteína prión natural (PrP) denominada PrP^{Sc}. Esta isoforma se caracteriza por unas propiedades bioquímicas particulares y especialmente, por un aumento de la resistencia a las proteasas.

El período de incubación significativamente largo que precede a los síntomas neurológicos sugiere que los acontecimientos importantes en la patogenia de la EET podrían tener lugar en localizaciones extranerviosas y especialmente en tejidos linfoides periféricos.

A pesar del desconocimiento existente en muchas areas, la detección de la PrP^{Sc} anormal se ha establecido como el método para confirmar el diagnóstico de EET. Esta detección se consigue fundamentalmente en tejidos nerviosos recogidos en autopsias.
También se ha detectado la PrP^{Sc} anormal en diversos tejidos y órganos linfoides: en los centros germinales del bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas y/o en el tejido linfoide asociado a las mucosas (a nivel de investigación), en modelos animales o en ovejas con tembladera, ciervos o alces con EDC y en pacientes con ECJv.

El test diseñado por el “Commissariat à l'Énergie Atomique - CEA” (la comisión francesa sobre energía atómica), desarrollado, elaborado y comercializado por Bio-Rad, permite la detección de la PrP^{Sc} en muestras de tejidos nerviosos tomadas de animales.

Esta determinación realizado con los siguientes reactivos y accesorios os:

- TeSeE™ SAP Combi Kit (192 pruebas)	Ref.: 355-1186
- TeSeE™ SAP Combi Kit (384 pruebas)	Ref.: 355-1192
- TeSeE™ SAP Combi Kit (768 pruebas)	Ref.: 355-1191
- Tubos de trituración (384 tubos)	Ref.: 355-1139
- Tubos de trituración (768 tubos)	Ref.: 355-1137
- Jeringa de calibración y aguja (x 200)	Ref.: 355-1174
o Placas de filtración (x 50)	Ref.: 355-1179
- Placas Deepwell (x 50)	Ref.: 359-0132
- Medium beads (x 2000)*	Ref.: 355-1171

** Solamente para tejidos periféricos.*

2 -TeSeE™ SAP Combi Kit

2-1 Principio

Los reactivos del TeSeE™ SAP Combi Kit permiten la purificación, la concentración, la Solubilización y la deteccion de la PrP^{Sc} a partir de muestras de tejidos obtenidas de animales infectados.

El TeSeE™ SAP Prueba es una técnica inmunoenzimática (formato "sandwich") en la que se usan dos anticuerpos monoclonales para la detección de la proteína priónica anormal, resistente a la proteinasa K, en los tejidos obtenidas de animales infectados. El kit contiene suficientes reactivos para realizar 192 ensayos (incluyendo controles).
La fase sólida se compone de 12 tiras de 8 pocillos de poliestireno recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal. El segundo anticuerpo monoclonal está unido a la peroxidasa.

2-2 Muestras

- **Bovinos:** la purificación de la PrP^{Sc} se realiza en muestras del Sistemo Nervioso Central (SNC).El utensilio de extracción EEB (Ref.: 355-1130) puede utilizarse para extraer tronco cerebral.
  Como la distribución de la PrP^{Sc} en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en el área del obex del tronco cerebral para una detección óptima. La jeringa de toma de muestras (Ref.: 355-1175) permite un muestreo fácil, rápido y seguro en el área del obex.
  Por favor, revise el protocolo de toma de muestras para obtener instrucciones detalladas sorbre el procedimiento de toma de mestras.

- **Pequeños ruminantes y cérvidos:** la purificación de la PrP^{Sc} se realiza en muestras del Sistemo Nervioso Central (SNC) o tejidos periféricos (nódulos linfáticos, bazo,…). El utensilio de extracción de los pequeños ruminantes (Ref.: 355-1184) puede utilizarse para extraer tanto tronco cerebral como cerebelo.
  Como la distribución de la PrP^{Sc} en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en área del obex del tronco cerebral para una detección óptima.
  Las muestras se cortan y se pesan individualmente.
  Nota: otros tejidos (amígdalas, íleon, párpados…) sólo pueden ser usados con fines de investigación.
  Las muestras se mantienen de +2ºC a + 8ºC cuando se realiza la purificación en 24 horas o se pueden conservar congeladas durante varios meses. Sólo se deben someter a 3 ciclos de congelación/descongelación. Si se tienen que transportar las muestras, se deben acondicionar de acuerdo con las leyes locales.

2-3 Composición de los TeSeE™ SAP Combi Kits

DÉSIGNATION	TYPES DE RÉACTIFS	PRÉSENTATION 355-1186 (192 pruebas)	355-1192 (384 pruebas)	3551191 (768 pruebas)	CONSERVATION
Réactivo A	Solución de desnaturalización	1 frasco (55 ml)	1 frasco (120 ml)	1 frasco (240 ml)	+2°C a +8°C
Réactivo B	Solución de precipitación Colorante: azul de bromofenol	1 frasco (55 ml)	1 frasco (120 ml)	2 frascos (120 ml)	+2°C a +8°C
Réactivo C	Tampón de solubilización Colorante : verde malaquita	1 frasco (7 ml)	1 frasco (14 ml)	1 frasco (28 ml)	+2°C a +8°C
PK	Proteinasa K Colorante: rojo de fenol	1 frasco (0.5 ml)	2 frascos (0.5 ml)	4 frascos (0.5 ml)	+2°C a +8°C
R1	**Microplaca:** 12 tiras de 8 pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-PrP	2 placas	4 placas	8 placas	+2°C a +8°C
R2	**Solución de lavado:** Concentrada 10x Tampón Tris-NaCl pH 7,4 Conservante: ProClin™ 300 (0,01%)	1 frasco (250 ml)	2 frascos (250 ml)	4 frascos (250 ml)	+2°C a +25°C
R3	**Control negativo:** Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (4 ml)	2 frascos (4 ml)	4 frascos (4 ml)	+2°C a +8°C
R4	**Control positivo:** Tampón PBS pH 7,4 suplementado con un péptido sintético no infeccioso. Liofilizado Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (qsp 4 ml)	2 frascos (qsp 4 ml)	4 frascos (qsp 4 ml)	+2°C a +8°C
R6	**Diluyente de las muestras:** Tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA y rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (35 ml)	1 frasco (70 ml)	1 frasco (140 ml)	+2°C a +8°C
R7	**Conjugado:** concentrado 10 veces del anticuerpo monoclonal anti-PrP marcado con peroxidasa en un tampón PBS pH 7,1 suplementada con proteínas bovinas y coloreada con rojo fenol Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 frasco (2.8 ml)	2 frascos (2.8 ml)	4 frascos (2.8 ml)	+2°C a +8°C
R8	**Tampón sustrato de la peroxidasa:** Solución de ácido cítrico y acetato de sodio pH 4,0 con H_2O_2 al 0,015% y dimetilsulfóxido al 4% (DMSO)	1 frasco (60 ml)	1 frasco (120 ml)	2 frascos (120 ml)	+2°C a +8°C
R9	**Cromógeno:** Solución de tetrametilbenzidina (TMB)	1 frasco (5 ml)	1 frasco (10 ml)	1 frasco (20 ml)	+2°C a +8°C
R10	**Solución de parada:** Ácido sulfúrico 1 N	1 frasco (28 ml)	1 frasco (56 ml)	1 frasco (112 ml)	+2°C a +8°C
	Películas adhesivas	8	12	16	

Los siguientes reactivos son componentes genéricos. reactivo A, reactivo B, diluyente de las muestras (R6), solución de lavado (R2), tampón sustrato de la peroxidasa (R8), cromógeno (R9) y solución de parada (R10). Pueden ser utilizados con cualquier lote del TeSeE™ SAP Kits.

2-4 Preparación de los reactivos

Antes de usar, permitir que los reactivos del TeSeE™ SAP Combi Kits alcancen la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos.

1 - Reactivos listos para usar

Reactivos A, B, C,El control negativo (R3), la solución de dilución de la muestra (R6) y la solución de parada (R10) estan listos para usar.

Microplacas (R1):

Antes de abrir la bolsa cerrada, hay que dejar que la microplaca se ajuste a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) en su envase protector con una bolsa desecante para evitar que se produzca condensación de agua en los pocillos. Abrir en el punto de soldadura y volver a meter inmediatamente las tiras no usadas en la bolsa.

Cerrar herméticamente la bolsa después de expulsar el aire que pudiese quedar y conservar de +2ºC a +8ºC.

2 - Reactivos a reconstituir

Proteinasa K :

El reactivo A es el tampón de dilución de la proteinasa K.

La solución se debe preparar de siguiente manera (4 µl de proteinasa K en 1 ml de reactivo A):

NÚMERO DE MUESTRAS	REACTIVO A	PROTEINASA K
2	1 ml	4 µl
10	3 ml	12 µl
18	5 ml	20 µl
26	7 ml	28 µl
34	9 ml	36 µl
42	11 ml	44 µl
50	13 ml	52 µl
58	15 ml	60 µl
66	17 ml	68 µl
74	19 ml	76 µl
82	21 ml	84 µl
90	23 ml	92 µl

Los volúmenes se deben medir con una pipeta de forma precisa. La punta de pipeta conteniendo la PK se debe aclarar mediante ciclos sucesivos de aspiración/distribución en el reactivo A.

Después de su reconstitución, homogeneizar la solución mediante inversiones sucesivas hasta obtener una solución homogénea roja.

Solución de lavado (R2):

Diluir la solución de lavado R2 hasta 1/10 en agua destilada o ultra pura (por ejemplo, 100 ml del reactivo R2 en 900 ml de agua destilada).

Control positivo (R4):

Golpear muy suavemente el frasco del control positivo (R4) en la poyata de laboratorio para desprender cualquier sustancia que se haya adherido al tapón de goma. Abrir el frasco y disolver el contenido en 4 ml del diluyente R6. Tapar y mantener en reposo aproximadamente 1 minuto, agitando suavemente de vez en cuando para facilitar la disolución.

Conjugado (R7):

Diluir el reactivo R7 hasta 1/10 en la solución de lavado recientemente reconstituida (por ejemplo, 0,1 ml del reactivo R7 en 0,9 ml de la solución de lavado reconstituida) teniendo en cuenta que es necesario 1 ml del conjugado preparado para completar 1 tira. Homogeneizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex®.

Solución de revelado enzimático (R8 + R9):
Diluir el reactivo R9 a 1/11 en el reactivo R8 (por ejemplo, 0.1 ml del reactivo R9 en 1 ml del reactivo R8) teniendo en cuenta que 1.1 ml de solución de revelado enzimática es necesario para completar 1 tira. Homogeneizar suavemente sin utilizar un agitador Vortex®.

2-5 Conservación, caducidad

Conservar el TeSeE™ SAP Combi Kits de +2ºC a +8ºC. Todos los reactivos son estables a esta temperatura hasta la fecha de caducidad indicada en el kit (antes y después de abrir los frascos). Después de la dilución, la solución reconstituida de proteinasa K a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) se debe usar en 6 horas.

Las caducidades de los reactivos después de la preparación son los siguientes:

ETIQUETADO	REACTIVOS	CADUCIDAD
R1	Microplaca en bolsa cerrada herméticamente	1 mes de +2ºC a +8ºC
R2	Solución de lavado reconstituida	24 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 2 semanas de +2ºC a +8ºC
R4	Control positivo reconstituido	2 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) 4 horas de +2ºC a +8ºC 6 meses a -20ºC Se recomienda dividir la solución reconstituida en alícuotas de 0,5 ml y guardarlas inmediatamente a -20ºC Se pueden someter a 3 ciclos consecutivos de congelación/descongelación.
R7	Solución conjugada reconstituida (con la solución de lavado diluida)	8 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C)
R8 + R9	Solución de revelado	6 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), siempre protegida de la luz

2-6 Procedimiento

Para el procesamiento semiautomático del protocolo de purificación, consultar el manual del operador de TeSeE™ NSP.

Protocole manuel:

1. Muestreos:

Para los tejidos periféricos (ganglios linfáticos, bazo) se tiene que añadir una bolita de tamaño medio ("Medium bead", Ref.: 355-1171) en el tubo de trituración antes de poner la muestra.

Tomar una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso del tronco cerebral, de preferencia en el área del obex o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico.

Depositar las muestras en los tubos de trituración, cerrar firmemente y proceder a la trituración en el homogeneizador (systemas Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™).

2. Trituración de la muestra:

Colocar los tubos en la corona del homogeneizador (systemas Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™). Realizar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros del instrumento:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 24™ or 48™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
TIempO (seg.)	45	2 x 45*	-	-
Velocidad	6.5	6.5	-	-
Programa	-	-	Programa 1	Programa 2

* Esperar 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Si la trituración es insuficiente, se pueden realizar hasta 2 ciclos más de agitación, asegurando que la temperatura del tubo vuelve a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) entre cada ciclo (usando hielo machacado, por ejemplo).

3. Transferencia de la muestra:
Sacar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogenizado por inversion antes de abrir los tubos.
Transferir el homogenizado con uno de los siguientes métodos:

• Método de jeringa de calibración
Coger 250 µl con la jeringa de calibración(Ref.: 355-1174) poniendo especial atención en sumergir la aguja en el fondo de las bolitas para evitar coger fragmentos de tejido poco homogenizados.
Transferir los 250 µl de muestra en un tubo Eppendorf de 2 ml o en una placa Deepwell (Ref.: 359- 0132).

• Método de placa de filtración
La transferencia y la filtración se hacen en distintas fases usando una placa de filtración (Ref. : 355-1179) y una placa Deepwell (Ref.: 359-0132), con una de las siguientes técnicas de filtración.

- Vacío:
Encajar la placa Deepwell (Ref.: 359-0132) (la placa madre) en el fondo del sistema de vacío, poner la tapa y seguidamente la placa de filtración (Ref.: 355-1179). Coger al meno 400 µl (≤ 1000 µl) con una punta de 1000 µl y transferir a los pocillos de la placa de filtración (Ref.: 355-1179), excluyendo las 6 primeras posiciones (desde A1 a F1) Poner un film de plastico sobre la placa de filtración. Poner el indicador de vacío de la bomba (Ref.: 359-0350) a 25,4 cm Hg (± 2.5%). Encender la bomba y chequear que el indicador marca el vacío correcto, abrir entonces la valvula del colector durante 1 minuto ± 6 s. Cerrar la valvula, apagar la bomba y liberar el vacío del colector.

- *Centrifugación*:
Coger al meno 400 µl (≤ 1000 µl) con una punta de 1000 µl y transferir a los pocillos de la placa de filtración (Ref.: 355-1179) antes de encajarla en la placa Deepwell (Ref.: 359-0132) (la placa madre), excluyendo las 6 primeras posiciones (desde A1 a F1). Poner un film de plastico sobre la placa de filtración.
Centrifugar el sistema complete (placa de filtración y placa Deepwell) durante 1 min a 500 g. Tener cuidado de mantener la placa de filtración de forma segura en posición sobre la placa Deepwell.
Nota : La centrífuga debe estar equipada con el rotor de microplacas Deepwell (Ref.: 359-0136), para la centrífuga Eppendorf 5804R (Ref.: 359-1396).

Independientemente de la técnica utilizada, descartar la placa de filtración y transferir 250 µl de muestra filtrada a otra placa Deepwell (la placa de purificación) para el protocolo manual o colocar directamente la placa madre en el NSP (véase el manual de operador del TeSeE™ NSP).

Nota : En este paso, los tubos de trituración tras la homogenización, los tubos Eppendorf y la placa Deepwell después de la transferencia de la muestra pueden guardarse, cerrrados:

	A temperatura ambiante (+18°C a +30°C) por 8 horas	A +2°C a 8°C (en hielo o en la nevera) por 15 horas	A -20°C por 1 año*
Tubos de trituración y los tubos Eppendorf	Sí	Sí	Sí
Placa Deepwell	Sí	Sí	No

* Las muestras congeladas se dejarán descongelar a Tª ambiente (+18°C a +30°C). Se pueden someter a un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación. Se deben homogenizar siempre por inversion antes de su uso.

4. Tratamiento con PK :
Distribuir 250 µl (± 10%) de solución de proteinasa K reconstituida [ver párrafo 2.4] en cada tubo o en cada pocillo de la placa de Purificación. No exceder intervalos de 5 minutos en la distribución de la proteinasa K reconstituida entre la primera y la última muestra. Homogenizar inmediatamente por inversión 10 veces los tubos cerrados o la placa Deepwell sellada con film de aluminio. No exceder los 2 minutos entre la homogenización y la incubación a 37°C. Incubar a 37°C ± 2°C en un termobloque durante 10 ± 1 minuto.
Nota: Si se usa la placa Deepwell, el termobloque debe estar equipado con un adaptador especial para dicha placa (Ref.: 359-0134).

5. Precipitación de la PrP^{Sc} con reactivo B:
Retirar los tubos o la placa Deepwell del termobloque. Abrir los tubos y distribuir 250 µl (± 10%) de reactivo B en todos los tubos o en cada pocillo de la placa Deepwell. Seguir el mismo orden de distribución que el descrito en el paso 4. No exceder intervalos de 2 minutos entre la retirada del termobloque y la homogenización. Dicha homogenización se realizará en las mismas condiciones que en el paso 4.

6. Concentración de la PrP^{Sc} (centrifugación):
Dentro de los 30 minutos siguientes a la distribución del reactivo B y el mezclado: centrifugar los tubos o la placa de purificación en las siguientes condiciones:

Centrifugación	Tubos		Placa Deepwell
Velocidad (g)	20 000	15 000	2 000
Tiempo (mm)	5	7	10
Temperatura (°C)	20	20	4

Nota: Para la placa Deepwell esperar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de centrifugar.

7. Aclarado de la muestra:
Descartar el sobrenadante invirtiendo los tubos en un contenedor de desechos. Secar los tubos mediante inversion en un papel absorbente durante 5 minutos.
O poner la placa Deepwell en el aspirador DW40 (Ref.: 359-0137). Seleccionar el programa 'TSE DW' y el número de tiras a utilizar. Los pocillos de la placa Deepwell deben quedar secos al final del proceso de aspiración mediante la inversión de la placa sobre papel absorbente durante 5 minutos.
Distribuir 25 µl (± 10%) de reactivo C en todos los tubos o pocillo de la placa Deepwell. No exceder un intervalo de 10 minutos entre el final de la operación de secado y la distribución del reactivo C.
Incubar inmediatamente durante 5 ± 1 minuto a 100°C ± 5°C. No exceeder los 2 minutos entre la distribución del reactivo C y el comienzo de la incubación. No sellar la placa Deepwell durante la incubación.
Nota : Si se usa la placa Deepwell, el termobloque debe estar equipado con un adaptador especial para dicha placa (Ref.: 359-0134).
Retirar los tubos o la placa Deepwell del incubador y homogenizar los tubos con un vórtex (5 ± 2 segundos).
Las muestras en tubos o Deepwell pueden ser almacenadas durante 5 horas a +2°C a +8°C o congeladas durante 72 horas a -20°C. Las muestras congeladas deben ser descongeladas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) y homogenizadas con un vortex (5 ± 2 segundos).

1. Retirar el soporte de microplacas y el número de tiras necesarias (R1) del envase protector. Guardar las tiras no usadas junto con la bolsa desecante en el envase de la microplaca y cerrarla herméticamente.

2. Preparar el control positivo (R4), según lo descrito en el capítulo 3.4.2.

3. Para cada serie de pruebas y para cada placa, distribuir 100 µl (± 10%) de control/muestra en los pocillos en el siguiente orden:
   - Pocillos A1, B1, C1, D1: control negativo (R3)
   - Pocillos E1, F1: control positivo (R4)
   - Pocillos G1, H1, etc… muestra diluida con el reactivo (R6)
   Cada muestra se deposita en un solo pocillo.

4. Cubrir con película adhesiva e incubar durante 30 minutos ± 2 minutos a 37ºC ± 2ºC.

5. Preparar la solución de lavado (R2).

6. Preparar la solución del conjugado (R7).

7. Retirar la película adhesiva y realizar 3 ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 3.
   No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.

8. Distribuir 100 µl (± 10%) de solución del conjugado (R7) en cada pocillo.

9. Tapar con una película adhesiva e incubar 30 minutos ± 2 minutos de +2ºC a +8ºC.

10. Preparar la solución de revelado enzimático (R8+R9).

11. Retirar la película adhesiva y realizar cinco ciclos de lavado. Se obtienen condiciones óptimas de lavado con lavadores de placas PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con el programa TSE 5.
    No dejar que la microplaca se quede al aire durante más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Secar por inversión en papel absorbente antes del siguiente paso.

12. Distribuir 100 µl (± 10%) de solución de revelado (R8+R9) en cada pocillo e incubar la placa en la oscuridad y a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos ± 2 minutos. No usar la película adhesiva durante esta incubación.

13. Añadir 100 µl (± 10%) de solución de parada (R10) a cada pocillo de acuerdo con la misma secuencia y el mismo orden utilizado en la distribución de la solución de revelado.

14. Limpiar cuidadosamente la cara inferior de la placa y determinar la densidad óptica a 450 nm - 620 nm (modo bicromático) en un máximo de 30 minutos después de parar la reacción (las tiras deben mantenerse siempre protegidas de la luz antes de la lectura).

Microplate washer parameters

NAME: TSE 3

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0,3	800	2,5	W1	0 (PW40/1575) 5 (PW41)	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0,3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

PLATE NAME: FLAT 01 (PW40/PW41) - FLAT 03 (1575)

BOT: SHAPE	ASP. HOR. POS.	CENTERING	ASP. VERT. POS.	BOT. VERT. POS.	B.W. VERT. POS.	HORIZONTAL SPEED	VERTICAL SPEED	ASP. DOWNW. SPEED	DISP. UPW. SPEED	BOT. DOWNW. SPEED	BOT. UPWARD SPEED	SHAKING AMPLITUDE	SHAKING SPEED
Flat	1,4	0,3	13,5	9,5	9,5	6	8	6	9	6	9	1	9

2-7 Cálculo e interpretación de los resultados

1) Cálculo de la densidad óptica (DO) media del control negativo

$\overline{OD\ R3}$ = media de los 4 valores de DO de los pocillos R3

2) Cálculo del valor umbral

El valor umbral es igual a: $\overline{OD\ R3}$ + 0.210

Ejemplo:

$\overline{OD\ R3}$ = 0.020

Valor umbral = = 0.020 + 0.210 = 0.230

3) Condición de validación de la prueba

• Control negativo (R3) :

a) Validación de los valores individuales del control negativo:

Todos los valores para el control negativo deben ser inferiores a 0,150 unidades de densidad óptica.

Se puede eliminar como máximo un valor individual si la densidad óptica es superior o igual a 0,150.

Se repite la prueba si más de 1 valor del control negativo sobrepasa 0,150.

b) Homogeneidad de los valores del control negativo:

Calcular la media de los valores de la densidad óptica de los controles negativos que quedan.

Las densidades opticas cuyos valores son superiores al valor de la media de las densidades opticas de los controles negativos mas 40% ($\overline{OD\ R3}$ + 40%) se deben eliminar.

- Si un valor esta eliminado en la parte a), solamente se puede descartar un valor en la parte b).
- Si ninguno de los valores esta eliminado en la parte a), se pueden eliminar como máximo dos valores en la parte b).

La prueba se debe repetir si más de dos valores de los controles negativos estan descartados [sección a)+b)].

• Controlo positivo (R4):

La media de las densidades ópticas de los controles positivos (DO R4) tiene que ser superior o igual a 1.00 (DO).

Se debe repetir la prueba si la media de la densidades ópticas de los controles positivos (DO R4) es menor de 1.00 (DO).

4) Interpretación de los resultados

Las muestras cuya densidad óptica sean inferior al valor umbral se consideran negativas según las instrucciones del TeSeE™ SAP Kit.

Sin embargo, los resultados situados justo por debajo del valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado y se deben volver a estudiar las muestras correspondientes por duplicado a partir del homogeneizado inicial.

Las muestras cuya densidad óptica sean mayor o igual al valor umbral se consideran inicialmente reactivas según las instrucciones del TeSeE™ SAP Kit y se deben volver a estudiar por duplicado,a partir del homogeneizado inicial, antes de la interpretación final.

Después de repetir la prueba, se considera que la prueba es positiva según las instrucciones del TeSeE™ SAP Kit cuando al menos una de las 2 medidas es positiva (mayor que o igual al valor umbral). Se considera que la prueba es negativa según las instrucciones del TeSeE™ SAP Kit cuando estos dos valores son menores que el valor umbral.

Las muestras repetidas por duplicado y que resulten negativas según las instrucciones del TeSeE™ SAP Kit, pero en las que uno de los 2 valores está próximo al valor umbral (valor umbral - 10%) deben interpretarse con cuidado.

2-8 Límites de la prueba
Pueden encontrarse dificultades durante el paso de trituración cuando se usan muestras deshidratadas o tejidos periféricos. Si es necesario, se puede repetir el paso de trituración (paso No.2 del procedimiento) varias veces con este tipo de muestras.

Un resultado negativo significa que la muestra analizada no contiene ninguna PrP^{Sc} detectable por el TeSeE™ SAP Combi Kit. Sin embargo, como los niveles muy bajos de PrP^{Sc} no pueden ser detectados, un resultado negativo no descarta la posibilidad de infección.
Cualquier muestra con un resultado positivo reproducible según los criterios de interpretación de la prueba tiene que estar confirmada de acuerdo con en el laboratorio de referencia nacional del país para las EETs, o el laboratorio de referencia de la Comunidad Europea en casos excepcionales.

3 - Material necesario pero no suministrado
- Agua destilada o agua ultra pura.
- Soluciones de hipoclorito de sodio 20 000 ppm (concentración final) e hidróxido de sodio 1 M (concentración final).
- Papel absorbente.
- Guantes desechables.
- Gafas protectoras o máscara con visor.

Paso de purificación:
- Microtubos de ensayo de polipropileno de 2 ml con tapas y un soporte de tubos adecuado.
- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables, que puedan distribuir volúmenes entre 20 µl y 500 µl.
- Homogeneizador de tejidos tipo Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 24™ o TeSeE™ PRECESS 48™*
- Centrífuga* adaptada a los microtubos de ensayo.
- Un incubador de microtubos* termostatizado a 37ºC ± 2ºC y un incubador de microtubos* termostatizado a 100ºC ± 5ºC.

Para la purificación semiautomática de la muestra: sistema TeSeE™ NSP.

Paso de detección:
- Pipetas automáticas o semiautomáticas regulables o fijas que puedan distribuir 50 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl.
- Tubos de ensayo graduados de 10 ml, 20 ml y 100 ml.
- Contenedores de desechos contaminantes.
- Incubador de microplaca termostatizado a 37ºC ± 2ºC.
- Cámara refrigerada de +2ºC a +8ºC.
- Sistema de lavado de microplacas automático o semiautomático.*
- Aparato de lectura de microplacas* (equipado con filtros de 450 nm y 620 nm).
- Sistema de microplacas* para la automatización de las etapas del protocolo del análisis. La calidad del sistema debe estar en concordancia con los requisitos del protocolo de la prueba.

** Contactar Bio-Rad para obtener la lista de los instrumentos disponibles.*

4 - Precauciones

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Los reactivos se deben conservar de +2ºC a +8ºC.
- No usar reactivos cuya caducidad haya expirado.
- No usar la proteinasa K reconstituida y conservada a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante más de 6 horas.
- No mezclar reactivos procedentes de TeSeE™ SAP Kits con diferentes números de lote en el mismo ensayo, excepto los reactivos genéricos: solución de lavado (R2), diluyente de las muestras (R6), tampón sustrato de la peroxidasa (R8), cromógeno (R9), solución de parada (R10), tubos de trituración, reactivo A y reactivo B.
- La solución de lavado (R2), el diluyente de las muestras (R6), el tampón sustrato de la peroxidasa (R8), el cromógeno (R9), la solución de parada (R10) y los tubos de trituración se pueden utilizar con otros productos de la gama TeSeE™ (TeSeE™, TeSeE™ SAP y TeSeE™ sheep/goat Pruebas).
- Permitir que los reactivos se ajusten a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 30 minutos antes de su uso.
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos, evitando cualquier contaminación.
- No realizar la prueba en presencia de vapores reactivos (ácidos, básicos, aldehídos) o polvo, que podrían alterar la actividad enzimática del conjugado.
- Usar sólo tubos de polipropileno.
- Usar elementos de vidrio perfectamente lavados, aclarados en agua destilada o preferiblemente, material desechable.
- No dejar que la microplaca se seque más de 5 minutos entre el final del lavado y la distribución de los reactivos.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. En consecuencia, ningún elemento metálico debe entrar en contacto con las diversas soluciones que contienen el conjugado o el sustrato.
- La solución de revelado (tampón de sustrato + cromógeno) debe ser incolora. La aparición de un color pocos minutos después de la reconstitución indica que no se puede usar el reactivo y debe reemplazarse. La solución de revelado se debe preparar preferiblemente en recipientes de plástico desechables o material de vidrio previamente lavado con ácido clorhídrico 1 N, aclarado en agua destilada y seco. Conservar esta solución protegida de la luz.
- Usar una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- El lavado de los pocillos es un paso esencial del procedimiento: respetar el número recomendado de ciclos de lavado y asegurarse de que todos los pocillos están completamente llenos y luego completamente vacíos. Un lavado incorrecto puede dar resultados incorrectos.
- No usar nunca el mismo recipiente ni la misma punta de pipeta para distribuir el conjugado y la solución de revelado.

5 - Normas de higiene y seguridad

De manera general las condiciones de higiene, las medidas de bioseguridad y los buenos métodos de trabajo tienen que seguir la recomendación de las autoridades legales del país.

- Todos los reactivos del kit están diseñados para su uso en el diagnóstico "*in vitro*".
- Utilizar guantes desechables durante la manipulation de los reactivos y de las muestras y lavarse las manos concienzudamente después de manipularlos.
- No pipetear con la boca.
- Usar contenedores de polipropileno para evitar cualquier herida con vidrio roto.
- Todos los materiales que estén en contacto directo con las muestras y las soluciones de lavado se deben considerar contaminados.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de las soluciones que las contienen.

- Las superficies contaminadas se deben limpiar con lejía a 20 000 ppm. Cuando el líquido contaminante es un ácido, las superficies contaminadas se deben neutralizar en primer lugar con soda antes de usar lejía. Las superficies se deben aclarar con agua destilada, se deben secar con etanol y limpiar con papel absorbente. El material empleado para el lavado se debe desechar en un contenedor especial para desechos contaminados.
- Las muestras, el material y los productos contaminados se deben eliminar después de la descontaminación:

- empapando en soda 1M (concentración final) durante una hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
- o empapando en lejía a 20 000 ppm durante 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
- o en autoclave a un mínimo de 134ºC durante por lo menos 18 minutos, bajo 3 bares de presión.

Nota: no autoclavar nunca soluciones que contengan lejía o reactivo B.

- Todas las operaciones implicadas en las pruebas de detección de la encefalopatía espongiforme transmisible (EET) están sometidas a leyes y se deben realizar en un laboratorio aislado, de acceso limitado y controlado, dedicados exclusivamente a esta actividad. Es obligatorio el uso de bata de laboratorio, calzas, guantes, máscaras con visor o máscaras simples con gafas de seguridad para garantizar la seguridad del operador.
- Los operadores deben recibir una formación específica sobre los riesgos relacionados con los agentes de la EET o priones y las formas validadas de descontaminación para agentes no convencionales. Las medidas de bioseguridad deben estar de acuerdo con las recomendaciones de las autoridades legales del país.
- Evitar cualquier contacto del tampón del sustrato, del cromógeno y de la solución de parada con la piel y las mucosas.
- Neutralizar o someter a autoclave todas las soluciones de lavado o los desechos de lavado de cualquier líquido que contengan muestras biológicas antes de su eliminación.
- El reactivo B está una sustancia peligrosa clasificada como nociva (> 25% alcohol) en la reglamentación europea.
- Los reactivos que contengan 0.1% del ProClin™ 300 son clasificados como preparaciones irritantes en la reglamentación europea.

Xn
(Alcohol > 25%)
(0.1% ProClin™ 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67: Inflamable. Nocivo en caso de ingestión. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de serias lesiones en caso de contacto con los ojos. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigos.
S : 7/9-13-26-28-37/39-46: Conservar el recipiente bien cerrado y en un lugar bien ventilado. Conservar apartado de alimentos y bebidas, incluyendo los destinados a animales. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un especialista. En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. Utilizar guantes apropiados y un sistema de protección de ojos/cara. En caso de ingestión, consultar inmediatamente con un médico y enseñarle el envase o la etiqueta.

6 - BIBLIOGRAFÍA

1. J. GRASSI, E. COMOY, S. SIMON, C. CREMINON, Y. FROBERT, S. TRAPMANN, H. SCHIMMEL, S.A.C. HAWKINS, J. MOYNAGH, JP DESLYS, G.A.H. WELLS (2001)
   Rapid Test for the preclinical postmorten diagnosis of BSE in central nervous system tissue.
   The Veterinary Record (149) 577-582.

2. JP. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI, J. MOYNAGH (2001)
   Screening slaughtered cattle for BSE - Nature (409) 476-477.

3. E. COMOY (2000)
   Contribution au développement d'un test de diagnostic post mortem des bovins atteints d'Encephalopathie Spongiforme Bovine.
   Thèse de doctorat vétérinaire (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort).

4. EUROPEAN COMMISSION
   Directorate General DG XXIV (1999).
   Preliminary Report : The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible Spongiform Encephalopathy in bovines.

5. JP. DESLYS (1999)
   Prevention du risque d'Encephalopathie Spongiforme Subaiguë Trans-missible.
   La Revue du Praticien (49) 966-970.

6. R. KNIGHT (1999)
   The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy - Vox sanguinis (76) 203-208.

7. D. DORMONT (1997)
   Les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou prions - Virologie (1) 11-22

8. F. HILLA, M. DESBRULAIS, S. JOINER, KCL SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, LJ. DOEY, P. LANTOS (1997)
   The same prion strain causes CJ disease and BSE - Nature (389) 448-450.

9. CI. LASMEZAS, JP. DESLYS, O. ROBAIN, D. DORMONT (1997)
   L'agent secret des maladies à prions - La Recherche 46-53.

10. AM. HAYWOOD (1997)
    Transmissible Spongiform Encephalopathies.
    The New England Journal of Medecine (337-25) 1821-1828.

11. J. COLLINGE, KC. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE, AF. HILL (1996)
    Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD.
    Nature (383) 685-690.

12. RG. WILL, J. IRONSIDE, M. ZEIDLER, SN. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN, PG. SMITH (1996)
    A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the U.K. - Lancet (347) 911-925.

13. SB. PRUSINER & AL (1993)
    Immunologic and molecular biologic studies of prion protein in Bovine Spongiform Encephalopathy.
    The Journal of Infectious Diseases (167) 602-613

Jeringa de muestra

Ref.: 355-1175

METODO DE MUESTREO PARA LOS ANALISIS DE SCREENING DE LA ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISIBLE (EET) DE Bio-Rad

ÍNDICE

1 - INFORMACIÓN GENERAL
- 1-1 Recogida de la muestra en el matadero
- 1-2 Procedimiento de muestreo en el laboratorio

2 - JERINGA DE MUESTRA DE BIO-RAD

3 - MASA DE MUESTRA NECESARIA PARA EL ANÁLISIS

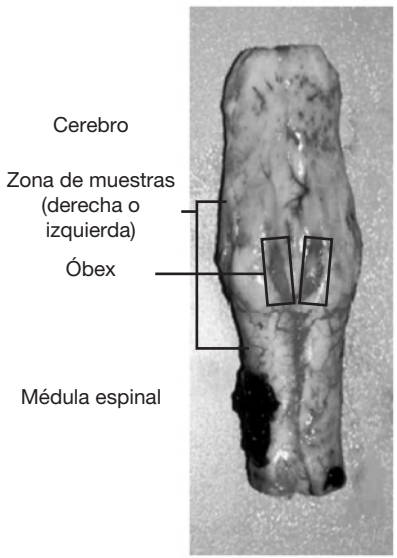
4 - PROCEDIMIENTO OPERATIVO

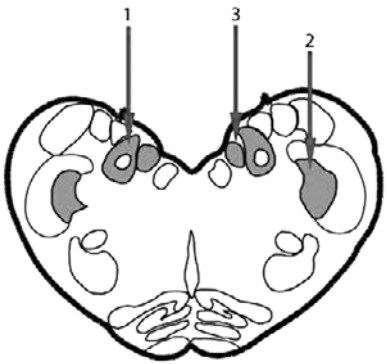
5 - PRECAUCIONES/ADVERTENCIAS

6 - PROCEDIMIENTOS DE SALUD Y SEGURIDAD

1 - INFORMACIÓN GENERAL

Los análisis de screening de la EET de Bio-Rad se aplican sobre una muestra de 350 ± 40 mg de tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC). La región anatómica específica para detectar la PrP^{Sc} de los animales infectados es el tronco encefálico, en concreto, la zona del núcleo del nervio vagal en la región del óbex. Esta es la región del tronco encefálico donde más se concentra la PrP^{Sc}.



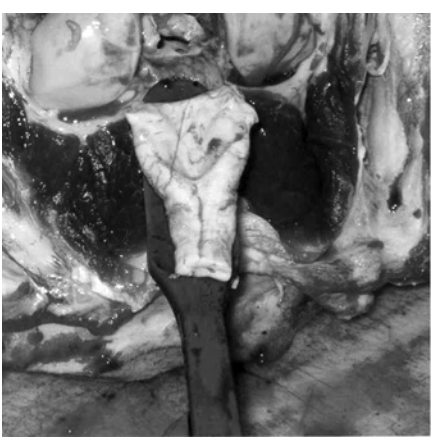


Corte transversalmente el tronco cerebral a nivel del óbex identificando las zonas claves para el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico en EEB [núcleo del tracto solitario (1) y núcleo del tracto del trigémino V (2) y scrapie (núcleo dorsal del vago (3)]

(Procedencia: OIE Manual de Análisis diagnósticos y vacunas para animales terrestres)

1-1 Recogida de la muestra en el matadero

El tronco encefálico se recoge de manera fácil y rápida con un instrumento adecuado o una cuchara de recogida de la muestra, a través del orificio occipital, sin abrir la cavidad craneal.



Recogida de la muestra con la cuchara de Bio-Rad

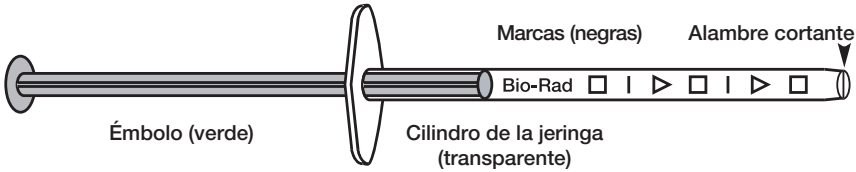
1-2 Procedimiento de muestreo en el laboratorio

Toda la muestra del tronco encefálico se remite al laboratorio de análisis procurando seguir las medidas pertinentes de seguridad biológica recomendadas por las autoridades sanitarias del país en cuestión. Dentro del laboratorio se corta la cantidad apropiada del material cerebral (hoja de bisturí…) de la región del óbex o se recoge con **la jeringa de muestra de Bio-Rad (Ref.: 355-1175)** que permite tomar la cantidad requerida de la región pertinente de un modo rápido y seguro sin riesgo de lesión por objetos punzantes o cortantes.

Seguidamente se describe el procedimiento para la recogida eficaz de la muestra de la región del óbex empleando la jeringa de muestra de Bio-Rad sin dañar el tejido.

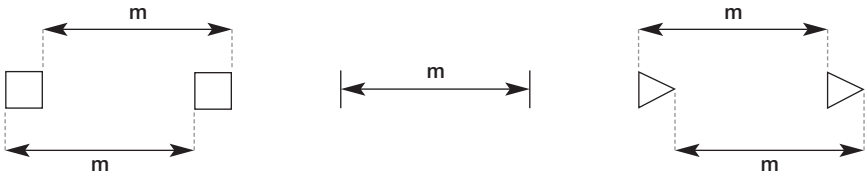
2 - JERINGA DE MUESTRA DE Bio-Rad

La jeringa de muestra de Bio-Rad consta de un émbolo verde y un cilindro transparente. El cilindro de la jeringa está rotulado con una serie de formas geométricas. (□ ▷ I)



3 - MASA DE MUESTRA NECESARIA PARA EL ANALISIS

La masa de la muestra debe ocupar el espacio entre dos símbolos de la misma forma; esta cifra corresponde a una masa (m) de 350 +/- 40 mg.



4 - PROCEDIMIENTO OPERATIVO

• Tome una jeringa de muestra y extraiga el émbolo verde hasta aproximadamente 1 cm de su posición inicial y luego llévelo otra vez a la posición inicial.

• Sujete con firmeza el tronco encefálico con una mano, empleando un envoltorio desechable (bolsa de plástico, guante, etc.) para evitar la posible contaminación cruzada de la muestra. El extremo del tronco encefálico debe permanecer accesible.

• Utilice la otra mano para colocar el extremo abierto de la jeringa de muestra en el lado derecho o izquierdo de la base del tronco encefálico.

Nota: después de recoger la muestra se debe poder efectuar una hemisección completa del tronco encefálico, con la región del óbex intacta, por si fuera necesario un análisis confirmatorio.

- Inserte poco a poco el cilindro de la jeringa dentro del tronco encefálico sin desplazar el émbolo verde (relativamente al tronco encefálico).

Nota: cuando tome la muestra de la región del óbex procure que el cilindro de la jeringa permanezca dentro del lugar elegido del tronco.

- Detenga el movimiento cuando la parte superior del cilindro haya alcanzado el límite alto de la zona de muestreo.

- Corte el cilindro de muestra dando una vuelta completa al cilindro de la jeringa.

- Extraiga lentamente el cilindro de muestra del tronco encefálico, procurando no dañar las estructuras vecinas. El resto del tronco encefálico se puede colocar en el envase original de la muestra.

- Verifique si se han quedado atrapadas burbujas de aire en el cilindro de la muestra. Si fuera necesario, comprima el cilindro de la muestra cerrando la parte superior del cilindro de la jeringa y empujando el émbolo verde hasta que desaparezcan las burbujas de aire retenidas. Al mismo tiempo, cerciórese de que el tejido próximo al orificio del cilindro de la jeringa sigue dentro de ella.

- Sin girar la parte superior del cilindro de la jeringa, desplace el émbolo verde hasta el símbolo siguiente.

- Compruebe que el cilindro de la muestra cubre, al menos, una zona correspondiente a “m” según se describe en la sección anterior de este documento (masa de muestra necesaria para el análisis).

- Tome un tubo de trituración y retire la tapa; desplace el émbolo verde con cuidado hasta el siguiente símbolo de forma idéntica para dispensar la masa correcta de tejido (“m”) en el tubo de trituración. Recuerde que debe llevar el émbolo hasta la posición correspondiente del símbolo siguiente, según se indica en "Masa de muestra necesaria para el análisis".

- Corte el cilindro de muestra sujetando la parte superior de la jeringa de muestra contra el borde interno del tubo de trituración.

- La parte no utilizada del cilindro de muestra se puede conservar llevando el cilindro de muestra al envase original junto con el resto del tronco encefálico.

5 - PRECAUCIONES/ADVERTENCIAS

Al igual que cuando se utiliza cualquier dispositivo de pipeteo, Bio-Rad recomienda una supervisión periódica de los operadores que utilicen la jeringa de muestra con la toma de una población estadística representativa de muestras para cerciorarse de la idoneidad del peso de cada muestra.

Las jeringas de muestra sólo se deben utilizar una vez y desechar a continuación para evitar cualquier contaminación cruzada de las muestras.
La muestra debe extraerse con todas las precauciones pertinentes para minimizar el riesgo de contaminación de los operadores.
Las jeringas utilizadas se desecharán una vez descontaminadas (véase instrucciones sobre salud y seguridad).
Si el cilindro de muestra no llena todo el cilindro de la jeringa, a pesar de efectuar correctamente el procedimiento, conviene pesar la muestra.

6 - PROCEDIMIENTOS DE SALUD Y SEGURIDAD

Las condiciones higiénicas, las medidas de seguridad biológica y las buenas prácticas de laboratorio se adaptarán a las directrices de las autoridades sanitarias del país.
La jeringa de muestra sólo está prevista para su uso con procedimientos diagnósticos "*in vitro*".

Póngase guantes desechables cuando manipule reactivos y muestras y lávese bien las manos después.

Todo equipo que haya entrado en contacto directo con las muestras debe considerarse contaminado.

Las superficies contaminadas se limpiarán con 20.000 ppm de una solución de hipoclorito sódico. Si el líquido contaminante es un ácido, las superficies contaminadas se neutralizarán primero con hidróxido sódico antes de utilizar el hipoclorito sódico. Hay que enjuagar las superficies con agua destilada, secarlas con etanol y frotarlas con un papel absorbente. El material de limpieza empleado se desechará en un envase específico para vertidos contaminados.

Las muestras, el equipo y los productos contaminados se eliminarán tras la descontaminación con uno de estos métodos:

- inmersión en hidróxido sódico 1 M (concentración final) durante 1 hora a temperatura ambiente (de +18°C a +30°C).
- inmersión en una solución de hipoclorito sódico clorométrica 20 000 ppm durante 1 hora a temperatura ambiente (de +18°C a +30°C).
- tratamiento con autoclave a una temperatura de al menos 134ºC durante un período mínimo de 18 minutos con una presión de 3 baros.
- **Nota: nunca meta en el autoclave soluciones que contengan lejía.**

Todas las operaciones implicadas en los análisis de screening de la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) se hallan sujetas a las directrices de seguridad local y deben aplicarse en un laboratorio aislado, limitado y de acceso controlado, dedicado exclusivamente a esta actividad. Para la seguridad del operador se exigirá el uso de una bata de laboratorio o uniforme de fogonero, calzas, guantes (dos pares), mascarilla con visor e mascarilla simple con gafas de seguridad para garantizar la seguridad del operator.

Los operadores recibirán adiestramiento específico acerca de los riesgos relacionados con los agentes de las EETs o priones y los métodos validados para la descontaminación de los agentes poco convencionales. Las medidas de seguridad biológica se ajustarán a las directrices de las autoridades sanitarias del país en cuestión.

Web site *www.bio-rad.com* ***USA*** *800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *01 877 89 01* ***Belgium*** *09 385 55 11* ***Brazil*** *55 31 3689 6600*
Canada *905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *420 241 430 532* ***Denmark*** *44 52 10 00* ***Finland*** *09 804 22 00*
France *01 47 95 69 65* ***Germany*** *089 31 884 0* ***Greece*** *30 210 777 4396* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *36 1 459 6100* ***India*** *91 124 4029300*
Israel *03 963 6050* ***Italy*** *39 02 216091* ***Japan*** *03 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Malaysia*** *60 3 2117 5260* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *0318 540666* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *23 38 41 30* ***Poland*** *48 22 331 99 99* ***Portugal*** *351 21 472 7700*
Russia *7 495 721 14 04* ***Singapore*** *65 6415 3170* ***South Africa*** *27 861 246 723* ***Spain*** *34 91 590 5200* ***Sweden*** *08 555 12700*
Switzerland *061 717 95 55* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 6518311* ***United Kingdom*** *020 8328 2000*

Bio-Rad
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tél.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33

Rev A - 11/2011
Code: 862230